

طراحی و ساخت ریزتراشه بلوغ آزمایشگاهی تخمک

سیاوش زرگری^۱، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، هادی ولادی^۲، دانشیار، بهناز صادق زاده اسکویی^۳، دکتری تخصصی، پرویز شهابی^۴، دانشیار، جواد فرونچی^۵، دانشیار، مریم پاشائی اصل^۶، دکترای پزشکی

۱- دانشکده مهندسی برق و کامپیوتر - دانشگاه تبریز - تبریز - ایران - s.zargari91@ms.tabrizu.ac.ir

۲- دانشکده مهندسی برق و کامپیوتر - دانشگاه تبریز - تبریز - ایران - veladi@tabrizu.ac.ir

۳- دانشکده پرستاری و مامائی - دانشگاه علوم پزشکی تبریز - تبریز - ایران - repbio.sbmu@gmail.com

۴- دانشکده پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی تبریز - تبریز - ایران - parvizshahabi@gmail.com

۵- دانشکده مهندسی برق و کامپیوتر - دانشگاه تبریز - تبریز - ایران - jfrounchi@tabrizu.ac.ir

۶- مرکز تحقیقات کاربردی داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز-تبریز - ایران - pashaim@tbzmed.ac.ir

چکیده: در این مقاله، با استفاده از فناوری ریزسیال به طراحی و ساخت ریزتراشه‌ای برای استفاده در فناوری کمک‌باروری و به‌طور خاص جهت بلوغ آزمایشگاهی تخمک پرداخته شده است. ابتدا با استفاده از نرم‌افزار COMSOL به بررسی و شبیه‌سازی ایده مطرح‌شده پرداخته و شکل هندسی بهینه به دست آورده شده است. پس از آن پروسه ساخت بهینه جهت ساخت ریزتراشه طراحی شده با استفاده از روش لیتوگرافی نرم بیان شده است. در ضمن نمونه ریزتراشه پلیمری از جنس پلیمر الاستومر PDMS در آزمایشگاه ریزساخت پیاده‌سازی گردیده و نمونه‌ها در چند مرحله در آزمایشگاه تحقیقات ناباروری تحت بررسی قرار گرفته و ایرادات موجود در این ریزتراشه شناسایی و مرتفع گردیده است. مقایسه نتایج نمونه‌های بلوغ‌یافته در ریزتراشه فوق با موارد تکوین‌یافته به روش استاندارد IVM بهبود قابل توجهی را نشان می‌دهد. یکی از نتایج بسیار مثبت به‌دست‌آمده، حذف سلول‌های پوششی از جداره خارجی تخمک‌ها همزمان با تکوین آن‌ها و بدون هرگونه دخالت فیزیکی و تزریق آنزیم‌های گران‌قیمت است که باعث کاهش تنش‌های وارد بر تخمک‌ها و نیز هزینه تمام‌شده هر سیکل IVM می‌شود.

واژه‌های کلیدی: فناوری کمک‌باروری، فناوری ریزسیال، بلوغ آزمایشگاهی، تخمک

Design and Fabrication of a Microfluidic Chip for In Vitro Oocyte Maturation

S. Zargari, Master of Science¹, H. Veladi, Assistant Professor², B. Sadeghzadeh, PhD Student³,

P. Shahabi, Assistant Professor⁴, J. Frounchi, Associated Professor⁵, M. Pashaei-asl⁶, M. D. Phd

1- 2- Microsystem Fabrication Laboratory, Faculty of Electrical and Computer Engineering, University of Tabriz, Tabriz, Iran, Email: s.zargari91@ms.tabrizu.ac.ir, veladi@tabrizu.ac.ir

3- Faculty of Nursing and Midwifery, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, Email: repbio.sbmu@gmail.com

4- Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, Email: parvizshahabi@gmail.com

5- Microsystem and Microelectronic Laboratory, Faculty of Electrical and Computer Engineering, University of Tabriz, Tabriz, Iran, Email: jfrounchi@tabrizu.ac.ir

6- Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, Email: pashaim@tbzmed.ac.ir

Abstract: In this paper, we designed and fabricated a microfluidic chip for in vitro oocyte maturation. All processes have been simulated using COMSOL multiphysics software prior to fabrication of the microchip, to achieve an optimized geometry. Finally, using soft lithography, we will discuss the different stages of optimized manufacturing process for the designed microchip in detail. The fabricated microchip has been implemented using the commercial elastomer, Poly dimethyl siloxane (PDMS) in the microfabrication laboratory and have been clinically evaluated over mice oocytes in different stages using infertility laboratory facilities and its issues has been identified and resolved. The maturation process has been compared to the standard IVM of oocytes and significant improvement has been observed.

Keywords: Assisted reproductive technology (ART), microfluidic technology, in vitro maturation (IVM), oocyte

تاریخ ارسال مقاله: ۱۳۹۴/۰۱/۱۱

تاریخ اصلاح مقاله: ۱۳۹۴/۰۳/۰۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۵/۰۵

نام نویسنده مسئول: هادی ولادی

نشانی نویسنده مسئول: ایران - تبریز - بلوار ۲۹ بهمن - دانشگاه تبریز - دانشکده مهندسی برق و کامپیوتر

۱- مقدمه

در طی دهه‌های گذشته، درمان‌های پزشکی برای برطرف کردن علل ناباروری تغییر و تحول چشم‌گیری پیدا کرده است. به مجموع این روش‌های درمانی، فناوری کمک‌باروری^۱ یا ART اطلاق می‌شود. اولین شکل ART که در اواخر دهه هفتاد میلادی ارائه گردید و هنوز هم رایج‌ترین نوع آن محسوب می‌شود، لقاح مصنوعی^۲ یا IVF است. لقاح مصنوعی برای اولین بار در دنیا در سال ۱۹۷۸ در انگلستان توسط دکتر رابرت ادواردز انجام شد که جایزه نوبل فیزیولوژی و پزشکی را در سال ۲۰۱۰ برای وی به ارمان آورد. لوئیزی براون، کودک حاصل از این لقاح در ۲۵ ژوئیه ۱۹۷۸ به دنیا آمد [۱]. جالب توجه است که لوئیزی خود در سال ۲۰۰۶ به روش طبیعی صاحب یک فرزند پسر گردید که خود بیانگر سیر موفق ART بوده است.

اگرچه فناوری کمک‌باروری در سال‌های اخیر پیشرفت زیادی داشته است، اما هنوز هم رویان‌هایی که در محیط آزمایشگاهی حاصل می‌شوند در مقایسه با رویان‌هایی که در محیط طبیعی (in vivo) حاصل می‌شوند کیفیت و نرخ باروری کم‌تری دارند. علاوه بر این ابزارآلات مورد استفاده برای این منظور نیز تغییرات زیادی پیدا نکرده‌اند [۲]. هنوز هم پیت‌های شیشه‌ای با سوراخ ریز و استفاده از پتری دیش‌های استاندارد، یکی از ابزارهای اساسی و پایه‌ای جنین شناسان محسوب می‌شود. فرایندهایی نظیر IVF، IVM و کشت رویان، نیازمند گذاشت و برداشت‌های تک‌تک تخمک‌ها و رویان‌ها چندین بار در هر مرحله است که در هر بار مقادیر عظیمی از محیط‌های کشت مصرف و جابجا می‌شود که مقرون به صرفه نیست [۳]. بر این اساس، نیاز به بهبود وسایل دست‌ورزی رویان و روش‌های آن احساس می‌شود.

با بهبود وسایل و روش‌ها، شباهت به شرایط in vivo فراهم خواهد شد. همچنین استفاده از سیستم کشت دینامیک می‌تواند نتایج مطلوب را با بهتر نمودن تقلید شرایط in vivo توسط تخمک و رویان بهبود بخشیده و بدین ترتیب استرس وارده بر آن‌ها را در خارج از شرایط زیست طبیعی کاهش دهد.

محیط‌های کشت طوری طراحی شده‌اند که شبیه مایع موجود در لوله‌های رحم مادر باشند. بدین منظور به این محیط‌ها، پروتئین‌ها و سرم انسانی یا حیوانی اضافه می‌گردد و رویان در شرایطی مشابه با بدن مادر رشد می‌یابد. به دلیل انتقال بیش از یک رویان، احتمال حاملگی چندقلویی در فناوری کمک‌باروری بالا است، به طوری که در زنان جوان‌تر این احتمال افزایش بیش‌تری نیز پیدا می‌کند. همچنین در این فناوری، احتمال آلودگی و استرس‌های وارده بر روی تخمک و با رویان بیش‌تر و قابلیت کنترل مراحل کم‌تر است. راه‌حل پیشنهادی برای رفع این مشکلات استفاده از فناوری ریزسیال^۴ است [۴].

فناوری ریزسیال، دانش و فناوری سیستم‌هایی است که مقادیر بسیار کم مایعات (در حدود نانولیتتر یا پیکولیتتر) را با استفاده از کانال‌هایی به ابعاد ده‌ها تا صدها میکرومتر فرآوری می‌کند [۵].

به عبارت دیگر فناوری ریزسیال، قلمرو نسبتاً جدیدی است که قواعد و اصول فیزیکی رفتار مایعات را در ابعاد ریز مطالعه می‌کند. فناوری ریزسیال به دلیل جابجایی مقادیر اندک نمونه‌ها و نیز استفاده از ویژگی‌های دینامیک سیالات در ابعاد میکرون برای دست‌ورزی راحت ریز محیط‌ها، به طور گسترده‌ای در علم شیمی کاربرد داشته است و علاوه بر این در مطالعه رفتار سلول‌ها و برهم‌کنش آن‌ها نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد [۶ و ۷]. هدف نهایی سیستم‌های ریزسیال، گنجاندن آزمایشگاه‌های شیمی و بیولوژی بر روی یک ریزتراشه است [۷].

فناوری ریزسیال، فناوری نوظهوری است که کاربردهای فراوانی در زمینه لقاح مصنوعی داشته است. به کارگیری فناوری ریزسیال در فناوری کمک‌باروری این امکان را به ما می‌دهد تا با استفاده از روش‌های الکترونیکی، اپتیکی، سیالی و ترکیب آن‌ها کنترل‌های لازم را در تمامی مراحل شکل‌گیری و تکوین رویان، بر روی آن اعمال نماییم. مشاهده بلادرنگ رویان در حال تکوین در زیر میکروسکوپ، نیاز به خارج‌سازی مکرر آن از محیط کشت و در نتیجه امکان بروز آلودگی‌های جانبی احتمالی را کاهش می‌دهد. همچنین با استفاده از فناوری ریزسیال قادر هستیم محیط کشت مناسب را در درون ریزتراشه فراهم نموده و با توجه به ابعاد کوچک آن، مقدار محیط کشت مورد نیاز به میزان فراوانی کاهش می‌یابد که از نظر هزینه بسیار مقرون به صرفه است. یکی دیگر از مهم‌ترین مراحل در پروسه لقاح مصنوعی، مرحله بلوغ آزمایشگاهی تخمک یا IVM است. تخمک‌های حاصل از بلوغ آزمایشگاهی در مقایسه با تخمک‌های مشابهی که به صورت طبیعی بالغ شده‌اند ضعیف‌تر و حساس‌تر بوده و صلاحیت تکوین کم‌تری از خود نشان می‌دهند. مطالعات جدید نشان می‌دهند که کشت تخمک‌های نابالغ در محیط‌های مشابه با شرایط in vivo می‌تواند در افزایش صلاحیت تکوین آن‌ها مؤثر باشد. در این مقاله، با استفاده از فناوری ریزسیال به طراحی ریزتراشه‌ای پرداخته شده است که با مشابه‌سازی شرایط رشد طبیعی تخمک درون بدن مادر، باعث بهبود شرایط بلوغ تخمک در محیط آزمایشگاهی شود.

در این مقاله روشی نوین، کم‌هزینه، ساده و سازگار با سلول‌های زیستی برای ساخت ریزتراشه بلوغ آزمایشگاهی تخمک ارائه می‌شود. مقرون به صرفه بودن، سادگی ساخت، کارایی بالایی ریزتراشه و ابعاد کوچک آن، از مزیت‌ها و نتایج مهم پروسه پیشنهادی است.

ساختار مقاله به این صورت است که در بخش دوم تئوری و روش‌های مورد استفاده برای شبیه‌سازی عملکرد ریزتراشه، در بخش سوم ساختار و پیکربندی ریزتراشه پیشنهادی، در بخش چهارم نتایج حاصل از شبیه‌سازی‌ها، در بخش پنجم پروسه پیشنهادی برای ساخت ریزتراشه، در بخش ششم نتایج آزمایش عملی ریزتراشه پیشنهادی و در نهایت نتیجه‌گیری کلی، ارائه و تبیین خواهد شد.

۲- تئوری و روش‌ها

در این بخش به تبیین پایه‌های نظری و تئوری دینامیک سیالات از دو دیدگاه میکرو و ماکرو خواهیم پرداخت.

سیالات به‌وسیله گروهی از معادلات با مشتقات جزئی غیرخطی بنام معادلات نویر-استوکس^۵ شناخته می‌شوند. این معادله در فرم برداری به‌صورت زیر است [۸]:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{u}) = 0 \quad (1)$$

$$\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \rho (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} + \nabla p - \mu \nabla^2 \mathbf{u} - (\lambda + \mu) \nabla (\nabla \cdot \mathbf{u}) = \mathbf{f} \quad (2)$$

که ρ بیانگر چگالی سیال، \mathbf{u} بردار سرعت سیال، p فشار موجود در سیال، μ گرانیوی دینامیک سیال، λ یک ضریب گرانیوی ثانی و \mathbf{f} بردار نیروی جرم سیال است. این رابطه عموماً برای یک سیال قابل تراکم چسبناک^۶ استفاده می‌شود. منظور از سیال قابل تراکم در علم مکانیک، سیالاتی هستند که چگالی آن‌ها به‌طور زیادی در اثر تغییر فشار، عوض می‌شود. با حرکت به‌سمت ابعاد کوچک و ریزسیالات، می‌توان مایع را غیرقابل تراکم در نظر گرفت، چراکه در این ابعاد تغییرات چگالی در ریزسیالات در اثر تغییرات فشار نامحسوس و قابل صرف‌نظر است که در این صورت معادلات حاکم، به‌صورت معادلات غیرقابل تراکم نویر-استوکس به‌صورت زیر ساده می‌شوند:

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = 0 \quad (3)$$

$$\frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} = -\frac{1}{\rho} \nabla p + \nu \nabla^2 \mathbf{u} \quad (4)$$

در این رابطه $\nu = \mu/\rho$ است که گرانیوی حرکتی^۷ اطلاق می‌شود.

تحلیل روابط به دلیل دشواری حل و شرایط مرزی پیچیده معمولاً به‌صورت FEM انجام می‌پذیرد. در این مقاله برای انجام شبیه‌سازی‌ها و تحلیل نتایج از نرم‌افزار COMSOL 3.5a استفاده شده است که قابلیت فراوانی برای تحلیل محیط‌های سیالی دارا است.

برای انجام شبیه‌سازی از سیالی با چگالی 997 Kg/m^3 و گرانیوی^۸ 0.01 Pa.S به‌عنوان محیط کشت استفاده شده است که مشابه محیط کشت مورد استفاده در آزمایشگاه‌ها و مراکز درمان ناباروری است [۹]. سیال با سرعت یکنواخت 0.5 mm/s (قابل قیاس با مقدار عملی) وارد ریزتراشه می‌شود. در خروجی ریزتراشه فشار برابر صفر در نظر گرفته شده و شرط مرزی بدون لغزش^۹ بر روی دیواره‌های ریزتراشه اعمال شده است.

۳- معرفی ساختار ریز تراشه پیشنهادی

همان‌طور که اشاره گردید کشت تخمک‌های نابالغ درون محیط‌هایی با شرایط مشابه محیط طبیعی باعث افزایش صلاحیت تکوین آن‌ها می‌شود. در محیط طبیعی تخمک‌های نابالغ پس از خروج از تخمدان مادر وارد لوله رحمی می‌شوند. لوله رحمی محیط پیچیده‌ای است که از لقاح تخمک و تکوین رویان در مراحل اولیه حمایت کرده و انتقال رویان

را به رحم تسهیل می‌کند. این انتقال به دلیل جریان تولیدشده توسط مژه‌ها و حرکات پرستالتیک تولیدشده توسط عضلات صاف لوله رحمی است. سرعت جریان لوله‌ای در پستانداران از $6/5$ تا 29 میکرومتر بر ثانیه تخمین زده شده است. این ریزمحیط دینامیک، تحریک مکانیکی رویان را فراهم می‌کند که به‌نوبه خود تأثیر به‌سزایی بر رشد و بلوغ تخمک و صلاحیت تکوین آن دارا است [۱۰].

هم‌اکنون بلوغ آزمایشگاهی تخمک در مراکز تحقیقاتی و درمان ناباروری به‌صورت کاملاً استاتیک و درون پتری‌دیش‌های معمولی صورت می‌گیرد. تخمک‌های نابالغی که از بدن مادر استخراج می‌شوند درون یک قطره از محیط کشت^{۱۰} (HTF) درون پتری‌دیش قرار داده شده و برای جلوگیری از تبخیر محیط کشت، پتری‌دیش حاوی قطره با روغن معدنی پر می‌شود. تخمک‌ها به‌منظور کنترل دما، میزان اکسیژن و CO_2 به مدت ۲۴ ساعت در این حالت درون انکوباتور و در دمای 37 درجه نگهداری می‌شوند تا مراحل بلوغ خود را طی نمایند. متأسفانه در حالت استاتیک اثری از جریان‌های لوله‌ای موجود در بدن مادر دیده نمی‌شوند و با وجود اینکه تخمک‌ها در این حالت به مرحله بلوغ می‌رسند ولی کیفیت رویان تولیدشده توسط این تخمک‌ها بسیار پایین است.

برای رفع این مشکل سعی در طراحی ریزتراشه‌ای شده است که بتواند شرایطی مشابه شرایط موجود در محیط طبیعی را درون ریزتراشه بازسازی نموده و باعث افزایش صلاحیت تکوین تخمک‌ها گردد. برای دستیابی به طرح بهینه، مطالعه بر روی تخمک‌ها و کسب اطلاعات اولیه درباره آن‌ها امری ضروری است. در این مقاله جهت رعایت موازین اخلاقی از نمونه‌های تخمک موش‌های سوری که از حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه شده‌اند استفاده می‌شود.

تخمک‌های نابالغی که از تخمدان مادر استخراج می‌شوند در ابتدا توسط سلول‌های گرانولوزا^{۱۱} پوشیده شده‌اند. این سلول‌ها وظیفه محافظت از تخمک را دارا می‌باشند و همچنین هورمونی ترشح می‌نمایند که باعث تسریع روند بلوغ تخمک می‌شود. قطر متوسط تخمک موش سوری به همراه سلول‌های پوششی آن در حدود 100 میکرومتر است. در شکل ۱ تصویری از تخمک نابالغ به همراه سلول‌های پوششی نشان داده شده است.



شکل ۱: تصویر میکروسکوپی از تخمک‌های نابالغ به همراه سلول‌های پوششی

در حالت بهینه برای عملکرد ریزتراشه، تخمک‌ها پس از تزریق به درون ریزکانال از طریق مخزن ورودی در ریزچمبرهای تعبیه شده در کف ریزکانال قرار می‌گیرند و جریانی دائمی ناشی از اختلاف سطح دو ستون مایع همواره محیط کشت را درون ریزکانال به جریان درمی‌آورد تا با تحریک مکانیکی تخمک‌ها باعث افزایش صلاحیت تکوین آن‌ها شود.

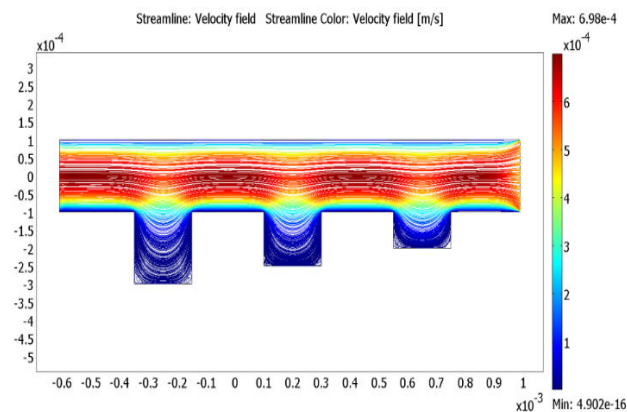
۴- نتایج شبیه‌سازی

در این بخش از مقاله به بررسی عمق بهینه برای ریزچمبرها، شبیه‌سازی نحوه حرکت مایع درون ریزتراشه و در اطراف ریزچمبرها، به دست آوردن پروفایل سرعت و نیروهای برشی وارده به تخمک‌ها درون ریزکانال پرداخته شده است.

یکی از پارامترهای بسیار مهم در شبیه‌سازی عملکرد ریزتراشه سرعت ورود سیال به درون ریزکانال است. سیال باید بتواند تخمک‌ها را درون ریزکانال به حرکت درآورده و آن‌ها را درون ریزچمبرهای موجود قرار دهد. برای نیل به این هدف، پس از تزریق تخمک‌ها به درون مخزن ورودی ریزتراشه به مدت ۲ دقیقه به دستگاه پمپ سرنگ متصل می‌گردد. پس از قرارگیری تخمک‌ها درون ریزچمبرها، ریزتراشه از دستگاه پمپ جدا گردیده و سیال با استفاده از فشار هیدرواستاتیک ناشی از اختلاف ارتفاع ستون مایع در مخزن‌ها درون ریزکانال جریان خواهد داشت. در این مقاله با استناد به مرجع [۱۲] سرعت مناسب برای ورود سیال به درون ریزکانال برابر ۰/۵ میلی‌متر بر ثانیه انتخاب گردیده است. لذا با توجه به ابعاد ریزکانال و چگالی سیال نرخ تزریق دستگاه پمپ سرنگ بایستی در حدود ۵۰ میکرولیتر در ساعت انتخاب گردد.

یکی از چالش‌ها در طراحی ریزتراشه IVM به دست آوردن عمق بهینه برای ریزچمبرها است. برای به دست آوردن عمق مناسب برای ریزچمبرها، طرح ارائه شده را با ۳ عمق ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومتر مورد بررسی و شبیه‌سازی قرار دادیم.

نحوه حرکت و سرعت حرکت سیال درون ریزتراشه به ترتیب در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است.

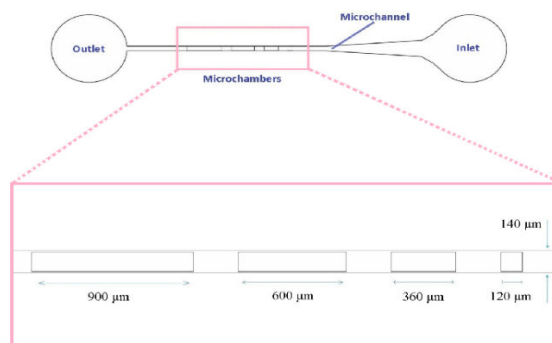


شکل ۳: نحوه حرکت سیال درون ریزتراشه

طرحی که در این مقاله برای ریزتراشه IVM مورداستفاده قرار گرفته است از دو مخزن ورودی و خروجی تشکیل می‌شود که توسط ریزکانالی با پهنای ۱۴۰ میکرومتر به یکدیگر متصل می‌شوند. از این مخزن‌ها برای ایجاد جریان لوله‌ای مشابه حالت طبیعی درون ریزتراشه و با استفاده از فشار هیدرواستاتیک ستون مایع استفاده شده است. در قسمت کف ریزکانال چاهک‌هایی (ریزچمبر) با پهنای ۱۲۰ میکرومتر، عمق ۲۰۰ میکرومتر و با طول‌های متفاوت جهت به دام انداختن و نگهداری تخمک‌ها تعبیه شده است. تمامی ابعاد بر اساس قطر متوسط تخمک موش سوری به‌عنوان مرجع انتخاب گردیده‌اند. هدف از این طرح به دام انداختن تخمک‌ها در گروه‌های یک‌تایی، سه‌تایی، پنج‌تایی و مشاهده تأثیر کشت تخمک‌ها به‌صورت گروهی بر روی رشد و تکوین آن‌ها است.

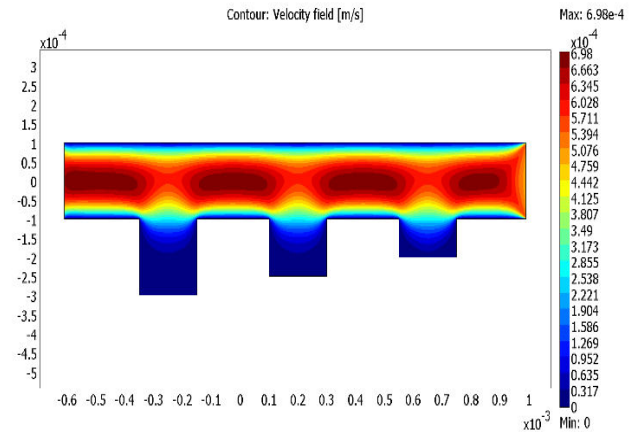
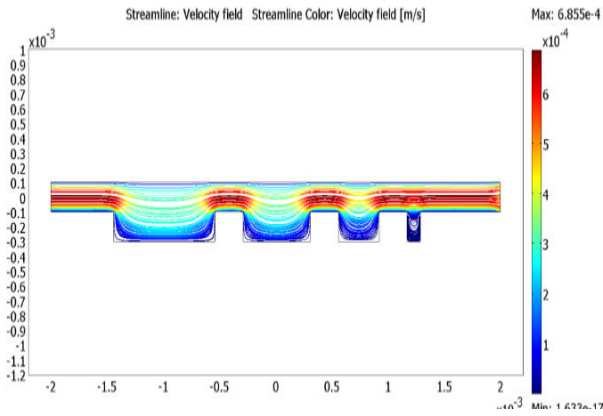
در تحقیقاتی که پیش از این بر روی کشت گروهی تخمک‌ها انجام یافته، نشان داده شده است که با کشت تخمک‌ها در گروه‌های چندتایی، تخمک‌ها بر روی یکدیگر اثرات مثبت متقابل بسیاری داشته و این امر باعث افزایش کیفیت تکوین تخمک می‌شود [۱۱]. عمق بهینه برای ریزچمبرهای موجود نیز ۲۰۰ میکرومتر است و روند دست‌یابی به این مقدار به‌طور مفصل در بخش بعدی توضیح داده شده است.

برای افزایش احتمال ورود تخمک‌ها به درون ریزکانال نیز پهنای بخش ورودی ریزکانال بسیار پهن‌تر از اندازه خود ریزکانال در نظر گرفته شده است. تصویری از طرح پیشنهادی برای این ریزتراشه در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: طرح پیشنهادی برای ریزتراشه IVM، شماتیک کلی ریزتراشه به همراه ریزچمبرهای تعبیه شده در کف ریزکانال (دید از نمای بالا)

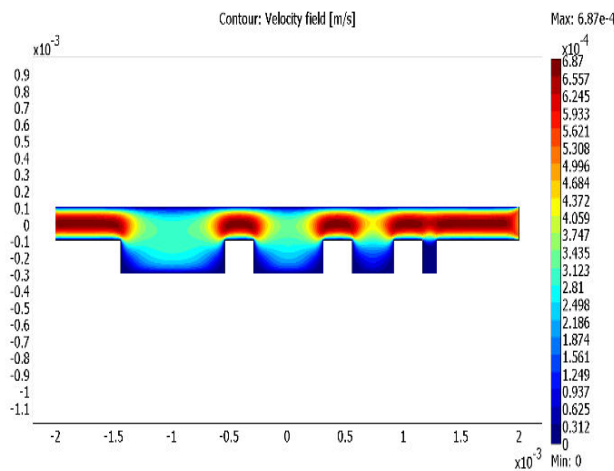
طول ریزکانال در این طرح برابر ۷ میلی‌متر انتخاب شده است و حجم ریزکانال در این حالت برابر ۱۷۰ نانولیتراست که قابل قیاس با حجم مایع موجود در اطراف تخمک‌ها در حالت طبیعی درون بدن مادر است. لازم به ذکر است که حجم مایع مورداستفاده در کشت تخمک‌ها به‌صورت استاتیک (درون قطره) در حدود ۱ میلی‌لیتر است که به‌مراتب بیش‌تر از شرایط طبیعی و شرایط موجود در ریزتراشه پیشنهادی است. افزایش حجم مایع در اطراف سلول‌ها باعث کاهش غلظت هورمون‌های ترشح شده از سلول‌های پوششی گردیده و باعث کاهش سرعت رشد و تکوین تخمک‌ها می‌شود.



شکل ۴: سرعت حرکت سیال درون ریزتراشه

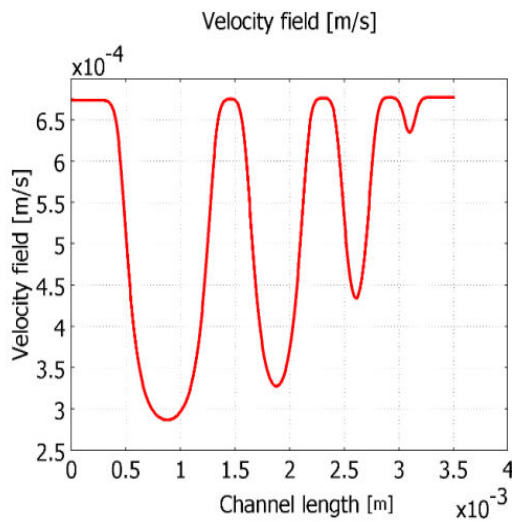
همان طور که مشاهده می شود سرعت سیال درون ریزچمبر با عمق ۱۰۰ میکرومتر نسبت به ریزچمبرهای با عمق ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومتر بیشتر است لذا نگهداری رویان در ریزچمبر ۲۰۰ میکرومتری نسبت به بقیه آسان تر خواهد بود.

در شکل ۵ نیز نمودار سرعت سیال درون ریزچمبر برحسب فاصله عمودی از کف آن در رنج صفر تا ۱۰۰ میکرومتر (قطر متوسط رویان موش سوری) نشان داده شده است.

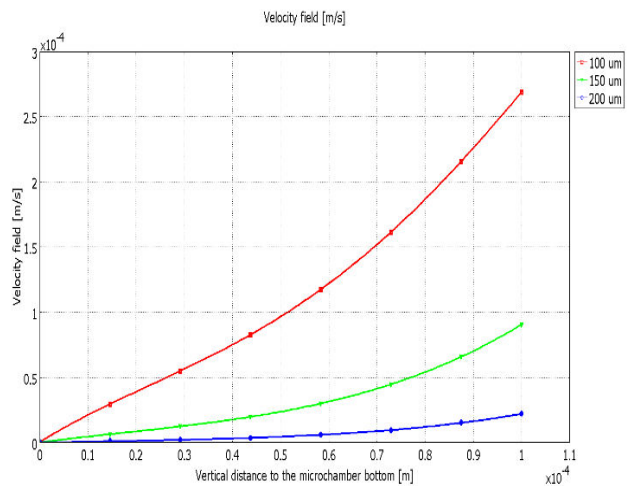


شکل ۷: سرعت حرکت سیال درون ریزتراشه پیشنهادی

تغییرات سرعت سیال درون ریزتراشه برحسب طول ریزتراشه نیز در شکل ۸ آورده شده است. کمترین مقادیر در طول کانال در وسط ریزچمبرها رخ می دهد.



شکل ۸: سرعت سیال درون ریزتراشه برحسب طول کانال



شکل ۵: سرعت سیال درون ریزچمبر برحسب فاصله عمودی از کف آن

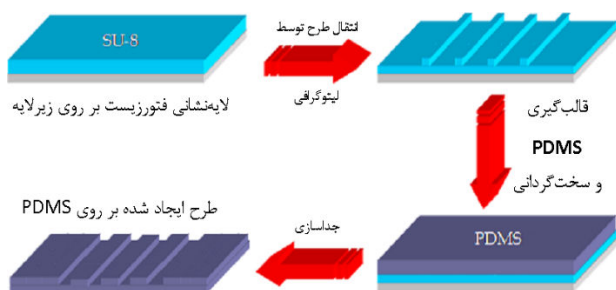
همان طور که مشاهده می شود بیشینه مقدار سرعت سیال در اطراف رویان به دام افتاده در ریزچمبرهای با عمق ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومتر به ترتیب ۴۶، ۸۲ و ۹۴ درصد نسبت به سرعت ورودی سیال (۵/۰ میلی متر بر ثانیه) کاهش یافته است. در نتیجه عمق بهینه برای ریزچمبرها در طرح پیشنهادی برابر ۲۰۰ میکرومتر در نظر گرفته شده است.

نحوه حرکت و سرعت حرکت سیال درون ریزتراشه پیشنهادی به ترتیب در شکل های ۶ و ۷ نشان داده شده است.

بر اساس شکل ۱۰ بیشینه نیروی برشی وارد بر رویان درون ریزکانال $0.4 \text{ dynes.cm}^{-2}$ بوده و بسیار کم‌تر از مقدار مجاز است. قله‌های ایجادشده نیز در محل لبه‌های ریزچمبرها رخ می‌دهد.

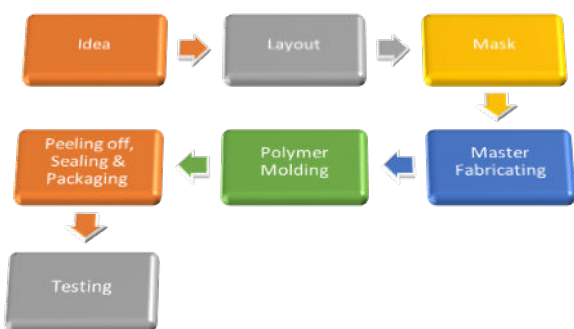
۵- ساخت ریزتراشه

یکی از بهترین و مرسوم‌ترین روش‌ها برای ساخت ادوات ریزسیال، استفاده از روش لیتوگرافی نرم^{۱۴} است. در این روش ابتدا با استفاده از فوتولیتوگرافی طرح موردنظر بر روی سطح اولیه ایجاد می‌شود که در اصطلاح به آن قالب گفته می‌شود. سپس از یک پلیمر الاستومر جهت قالب‌گیری استفاده می‌شود. پلیمر PDMS^{۱۵} به علت ویژگی الاستیکی، زیست‌سازگاری و پروسه ساخت آسان کاربرد زیادی در لیتوگرافی نرم دارد. مراحل کلی روش لیتوگرافی نرم در شکل ۱۱ نشان داده شده است.



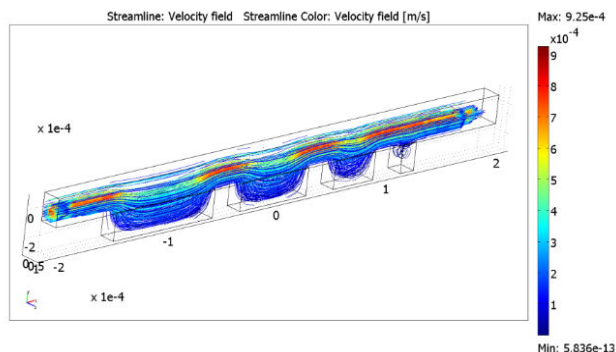
شکل ۱۱: مراحل لیتوگرافی نرم

از مزایای اصلی روش لیتوگرافی نرم می‌توان به قیمت پایین، زمان نسبتاً کم ساخت نمونه و همچنین عدم نیاز به اتاق تمیز^{۱۶} جهت قالب‌گیری نمونه پس از آماده‌سازی قالب اشاره کرد. با توجه به ویژگی‌های ذکرشده، در این مقاله از روش لیتوگرافی نرم در ساخت ریزتراشه بلوغ آزمایشگاهی تخمک استفاده شده است. مراحل کلی ساخت ریزتراشه در شکل ۱۲ نشان داده شده است.



شکل ۱۲: مراحل کلی ساخت ریزتراشه

اولین گام در ساخت ادوات ریزسیال با استفاده از روش لیتوگرافی نرم شکل‌گیری، ارائه و بهبود طرح اولیه ریزتراشه و رسیدن به طرح نهایی بر اساس اهداف موردنظر است. در مرحله بعد طرح نهایی با



شکل ۹: نحوه حرکت سیال درون ریزتراشه پیشنهادی در حالت سه‌بعدی

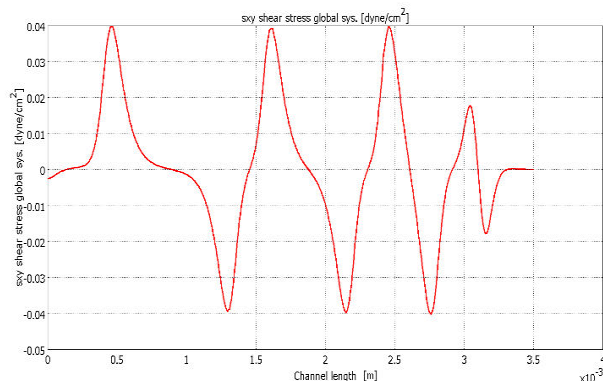
نحوه حرکت سیال درون ریزتراشه نهایی در حالت سه‌بعدی نیز در شکل ۹ آورده شده است.

یکی از پارامترهای بسیار مهم در بررسی ریزتراشه مقدار بیشینه نیروی برشی^{۱۳} وارده بر رویان درون ریزکانال است. تحقیقات پیشین انجام‌یافته در این زمینه نشان می‌دهد که حداکثر نیروی برشی که رویان می‌تواند بدون آسیب جدی تحمل نماید برابر $1/2 \text{ dynes.cm}^{-2}$ است [۱۰ و ۱۳]. لذا بررسی نیروهای برشی وارده بر رویان درون ریزتراشه امری ضروری است.

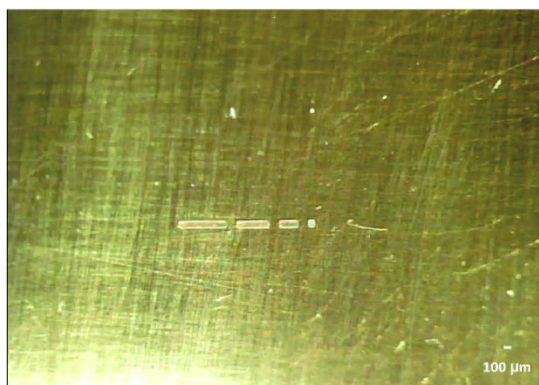
برای شبیه‌سازی نیروی برشی وارد بر رویان درون ریزکانال بایستی رابطه نیروی برشی وارد بر آن را در اختیار داشته باشیم. به دست آوردن این رابطه نیاز به انجام محاسبات ریاضی بسیاری خواهد داشت و ما در این قسمت فقط به ذکر رابطه به دست آمده بسنده می‌نماییم. برای به دست آوردن نیروی برشی وارده بر رویان درون ریزکانال از رابطه (۵) استفاده شده است [۱۴].

$$\tau_s = \frac{6 \times 2.95 \mu Q}{H^2} \quad (5)$$

در این رابطه τ_s بیشینه نیروی برشی وارد بر رویان، μ گرانیوی سیال، Q نرخ ورود سیال و H نیز ارتفاع ریزکانال است. با استفاده از این رابطه نیروی برشی بیشینه در طول ریزتراشه را به دست آوردیم. نتیجه شبیه‌سازی در شکل ۱۰ نشان داده شده است.



شکل ۱۰: نیروی برشی وارده بر رویان در طول ریزتراشه

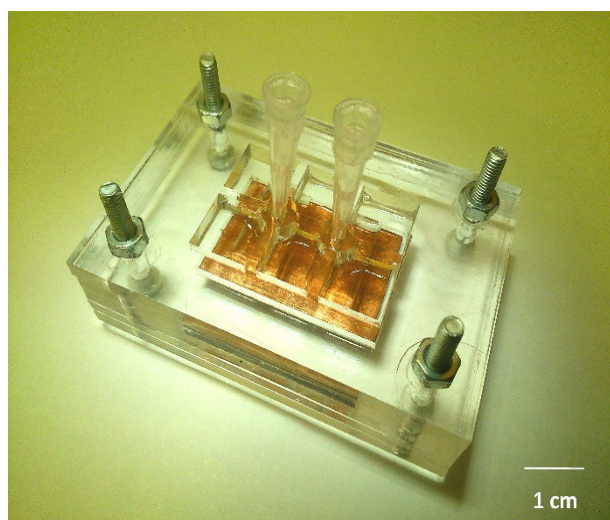


b

شکل ۱۴: قالب‌های SU-8 ساخته شده برای (a) ریزکانال و (b) ریزچمبرها

مراحل ساخت قالب ریزکانال و قالب‌های به دست آمده برای ساخت ریزکانال و ریزچمبرها به ترتیب در شکل‌های ۱۳ و ۱۴ نشان داده شده است.

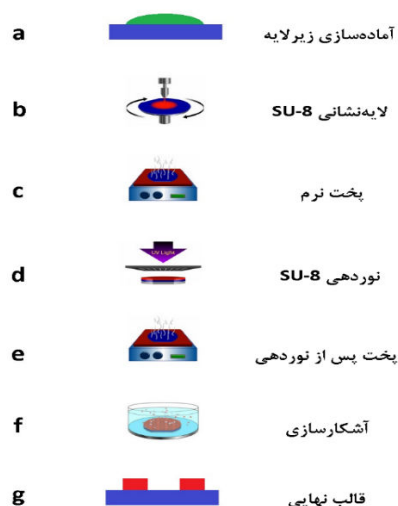
PDMS از دو جزء اصلی یعنی پلیمر اولیه^{۱۷} و ماده سفت کننده^{۱۸} تشکیل می‌گردد. پلیمر اولیه دارای گرانیروی بسیار بالا و ماده سفت کننده دارای گرانیروی به مراتب کمتری است که بعد از مخلوط شدن با پلیمر اولیه به نسبت حجمی ۱ به ۱۰، گرانیروی مخلوط حاصل کم‌تر می‌شود. در این مرحله نیاز است که دو جزء به مدت چند دقیقه به خوبی باهم مخلوط شوند. برای حذف حباب‌های ایجاد شده در زمان مخلوط کردن دو جزء PDMS، مخلوط حاصل به مدت چند دقیقه درون دستگاه پمپ خلأ قرار داده می‌شود. پس از این مرحله، PDMS آماده قالب‌گیری است. برای قالب‌گیری لایه‌های مختلف ریزتراشه و به دست آوردن ریزتراشه‌ای تمیز و تشکیل از قالب‌های مختلفی از جنس Plexiglass استفاده شده است. تصویر قالب استفاده شده برای ساخت این ریزتراشه در شکل ۱۵ نشان داده شده است.



شکل ۱۵: قالب مورد استفاده برای ساخت ریزتراشه IVM

استفاده از یکی از نرم‌افزارهای CAD (Autocad, Ledit) و غیره) ترسیم می‌گردد. گام بعدی انتقال طرح ترسیم شده بر روی کاغذ شفاف و تهیه ماسک است.

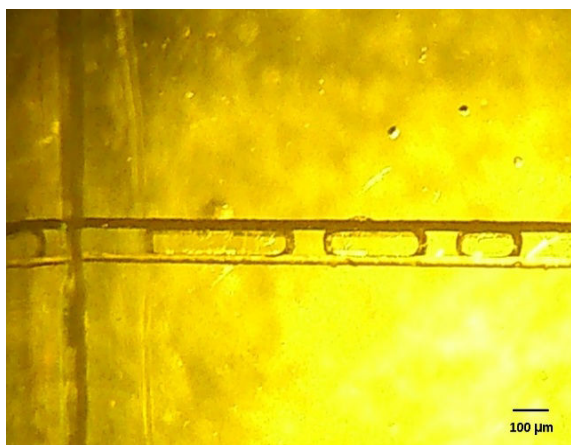
پس از آماده‌سازی ماسک نوبت به ساخت قالب اصلی می‌رسد. از مرسوم‌ترین روش‌ها برای ساخت قالب می‌توان به ساخت با استفاده از فتورزیست‌های مایع (معمولاً SU-8)، ساخت با استفاده از فیلم فتورزیست، حکاکی لیزری و نیز اخیراً چاپ سه بعدی اشاره نمود. پس از ساخت و آماده‌سازی قالب پلیمر الاستومر مورد نظر (معمولاً PDMS یا RTV) بر روی قالب ریخته شده و پس از سفت شدن، طرح قالب بر روی پلیمر شکل می‌گیرد. در ادامه پلیمر از روی قالب جدا شده و بر روی بستری مانند شیشه چسبانده می‌شود. در این مرحله ریزتراشه آماده تست با اعمال سیال مورد نظر است. در این مقاله برای ساخت قالب ریزکانال از فتورزیست SU-8 استفاده گردیده و پلیمر تزریق شده درون قالب نیز پلی دی‌متیل سیلوکسان (PDMS) است. به علت سهولت دسترسی به فیبر مدار چاپی و هزینه پایین آن، از فیبر مدار چاپی به عنوان زیرلایه اصلی جهت ساخت قالب‌ها استفاده شده است.



شکل ۱۳: مراحل ساخت قالب SU-8 [۱۵]



a



شکل ۱۸: تصویر میکروسکوپی تهیه شده از ریزچمبرها

۶- آزمایش عملی ریزتراشه

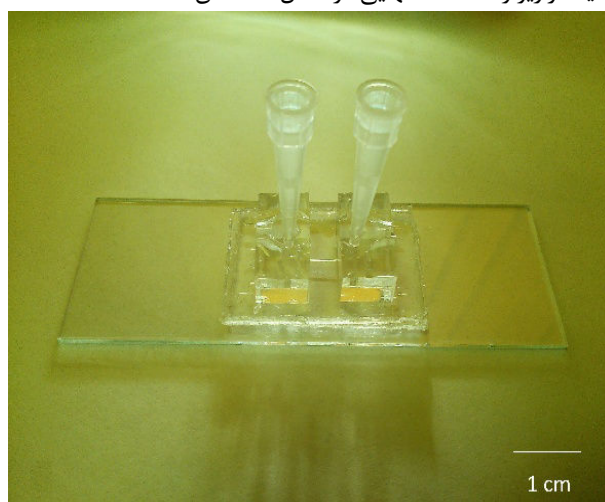
آزمایش‌های عملی بر روی ریزتراشه ساخته شده به منظور تعیین کارایی ریزتراشه در نگه‌داری و تکوین تخمک‌های نابالغ در مرکز علوم تحقیقات کاربردی و دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام پذیرفت. جهت ضدعفونی کردن ریزتراشه ابتدا محلول اتانول به درون ریزکانال تزریق گردیده و پس از خشک کردن درون اجاق به مدت ۳۰ دقیقه تحت تابش نور فرابنفش قرار گرفت. برای کاهش چسبندگی سلول‌ها به PDMS، ریزتراشه با محلول BSA^{۲۰} پر شده و ۲۰ دقیقه در این حالت نگه‌داری گردید.

در مرحله آزمایش، ریزکانال از قبل توسط محلول HTF پر شده و پس از تزریق تخمک‌ها به درون مخزن ورودی، ریزتراشه به مدت ۵ دقیقه در این حالت نگه‌داری می‌شود. برای هدایت تخمک‌ها به سمت ریزچمبرها، ریزتراشه به مدت ۲ دقیقه به دستگاه پمپ سرنگ با سرعت ۰/۵ میلی‌متر بر ثانیه متصل می‌شود. شکل‌های ۱۹ و ۲۰ به ترتیب ریزتراشه را در مرحله آزمایش عملی و تخمک‌های به‌دام‌افتاده درون ریزچمبرها را نشان می‌دهند.



شکل ۱۹: مرحله تست آزمایشگاهی ریزتراشه

جهت سخت کردن مخلوط PDMS، لازم است مخلوط حاصل به مدت ۹۰ دقیقه درون اجاق و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شود. در اصطلاح به این مرحله بسته شدن^{۱۹} گفته می‌شود. بعد از سخت شدن PDMS، می‌توان آن را به آرامی از روی قالب جدا نموده و برای ادامه روند ساخت مورد استفاده قرار داد. معمولاً در این مرحله قطعه بر روی لایه‌ای از PDMS و یا شیشه پیوند داده می‌شود. به منظور افزایش میزان چسبندگی، سطوح PDMS و شیشه به مدت ۴ دقیقه توسط دستگاه کرونا فعال گردیده و سپس تحت فشار به یکدیگر چسبانده می‌شوند. برای مستحکم‌تر کردن پیوند سطوح، لایه‌های چسبانده شده به مدت ۲۰ دقیقه درون اجاق و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شوند. تمامی مراحل ساخت در آزمایشگاه ریزساخت دانشکده مهندسی برق و کامپیوتر دانشگاه تبریز به انجام رسیده و ریزتراشه IVM نهایی در شکل ۱۶ نشان داده شده است.



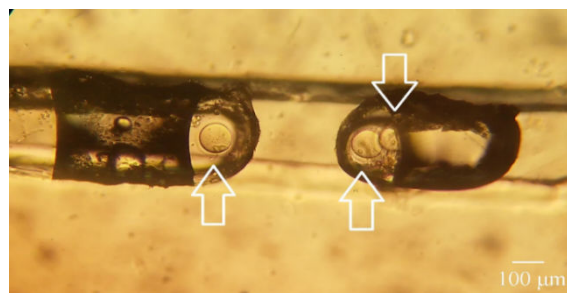
شکل ۱۶: ریزتراشه نهایی IVM

تصاویر میکروسکوپی تهیه شده از ریزکانال (مخزن ورودی) و نیز ریزچمبرها در شکل‌های ۱۷ و ۱۸ نشان داده شده‌اند.



شکل ۱۷: تصویر میکروسکوپی تهیه شده از ریزکانال

عددی برای ریزتراشه پیشنهادی در حالت دائمی انجام گرفت و نمودار سرعت و نحوه حرکت سیال درون ریزتراشه و نیروهای برشی وارد بر تخمک درون ریزتراشه به همراه نتایج آزمایش عملی ریزتراشه ارائه گردید. ریزتراشه پیشنهادی می‌تواند جایگزین بسیار مناسبی برای روش‌های کشت استاتیک کنونی در مراکز درمان ناباروری باشد. مهم‌تر آن‌که، سادگی ساخت و امکان تولید انبوه برای این ریزتراشه، صرفه-جویی زمانی و اقتصادی بالایی را به همراه می‌آورد.



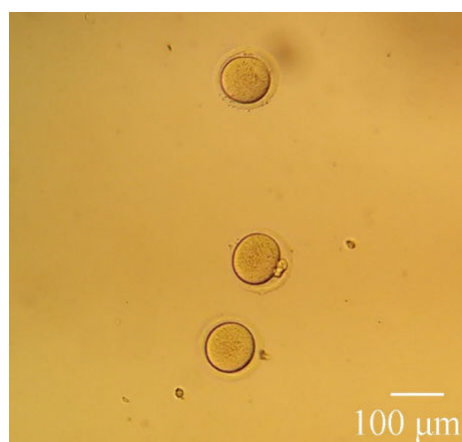
شکل ۲۰: تصویری از تخمک‌های به‌دام‌افتاده درون ریزتراشه

مراجع

- [1] L. A. Schieve, S. A. Rasmussen, G. M. Buck, D. E. Schemed, M. A. Reynolds and V. C. Wright, "Are children born after assisted reproductive technology at increased risk for adverse health outcomes," *Obstetrics & Gynecology*, vol. 103, no. 6, pp. 1154-1163, 2004.
- [2] J. E. Swain, D. Lai, S. Takayama and G. D. Smith, "Thinking big by thinking small: application of microfluidic technology to improve ART," *Lab on a chip*, vol. 13, no. 7, pp. 1213-1224, 2013.
- [3] D. J. Beebe, I. K. Glasgow and M. B. Wheeler, "Microfluidic embryo and/or oocyte handling device and method," *U. S. Patent*, no. US6193647 B1, 2001.
- [4] Y. Heo, *Improvement of In Vitro Fertilization (IVF) Technology through Microfluidics*, Ph.D. Thesis, University of Michigan, Michigan, 2008.
- [5] G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics," *Nature*, vol. 442, no. 1, pp. 368-373, 2006.
- [6] A. J. Tomlinson, N. A. Guzman and S. Naylor, "Enhancement of concentration limits of detection in CE and GEMS: A review of on-line sample extraction, cleanup, analyte preconcentration, and microreactor technology," *Journal of Capillary Electrophoresis*, vol. 2, no. 6, pp. 247-266, 1995.
- [7] D. J. Beebe, G. A. Mensing and G. Walker, "M. Physics and applications of microfluidics in biology," *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 4, no. 1, pp. 261-286, 2002.
- [8] J. A. Pelesko and D. H. Bernstein, *Modeling MEMS and NEMS*, A CRC Press, ch. 2, pp. 40-47, 2003.
- [9] H. Singh, E. S. Ang, T. T. Lim and D. W. Huttmacher, "Flow modeling in a novel non-perfusion conical bioreactor," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 97, no. 5, pp. 1291-1299, 2007.
- [10] A. M. Rocha and G. D. Smith, "Culture systems: Fluid dynamic embryo culture systems (microfluidics)," *Methods in Molecular Biology*, vol. 912, pp. 355-365, 2012.
- [11] T. C. Esteves, F. Rossem, V. Nordhoff, S. Schlatt, M. Boiani and S. L. Gac, "A microfluidic system supports single mouse embryo culture leading to full-term development," *RSC Advances*, vol. 3, no. 48, pp. 26451-26458, 2013.
- [12] A. Manbachi, S. Shrivastava, M. Cioffi, B. G. Chung, M. Moretti, U. Demirci, M. Yliperttula and A. Khademhosseini, "Microcirculation within grooved substrates regulates cell positioning and cell docking inside microfluidic channels," *Lab Chip*, vol. 8, no. 5, pp. 747-754, 2008.
- [13] Y. Xie, F. Wang, W. Zhong, E. Puscheck, H. Shen and D. A Rappolee, "Shear stress induces preimplantation embryo death that is delayed by the zona pellusida and associated with stress-activated protein kinase-mediated apoptosis," *Biology of Reproduction*, vol. 75, no. 1, pp. 45-55, 2006.
- [14] P. D. Gaver and S. M. Kute, "A Theoretical Model Study of the Influence of Fluid Stresses on a Cell Adhering to a

با قرارگیری تخمک‌ها درون ریزچمبرها، مخزن ورودی با محیط HTF پر شده و جهت جلوگیری از تبخیر محیط یک قطره روغن معدنی بر روی آن قرار داده می‌شود. سپس ریزتراشه جهت مشابه‌سازی شرایط طبیعی بدن میزبان درون انکوباتور (۵٪ CO₂ / ۹۵٪ O₂) و در دمای کنترل شده ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری می‌شود. مراحل رشد و تکوین تخمک‌ها در فواصل زمانی منظم مشاهده گردید و نتایج حاصل بیانگر شباهت بسیار زیاد تکوین تخمک‌های درون تراشه ریزسیال به روند تکوین تخمک در شرایط طبیعی بدن میزبان است. علاوه‌براین، یکی از امتیازات بسیار مثبت ریزتراشه حذف سلول‌های پوششی از جداره خارجی تخمک‌ها همزمان با تکوین آن‌ها و بدون هرگونه دخالت فیزیکی و تزریق آنزیم‌های گران‌قیمت است که باعث کاهش تنش‌های وارد بر تخمک‌ها و نیز هزینه تمام‌شده هر سیکل IVM می‌شود.

برای خارج کردن تخمک‌های بالغ از درون ریزتراشه، مجدداً آن را به دستگاه پمپ سرنگ متصل کرده و سرعت تزریق را به تدریج افزایش می‌دهیم تا تخمک‌ها بتوانند از درون ریزچمبرها خارج شده و در مخزن خروجی قرار گیرند و با استفاده از پمپ از تراشه خارج شوند. شکل ۲۱ تخمک‌های بالغ آماده لقاح را درون مخزن خروجی نشان می‌دهد.



شکل ۲۱: تخمک‌های بالغ داخل مخزن خروجی

۷- نتیجه‌گیری

در این مقاله روشی نوین، ساده و مقرون‌به‌صرفه برای ساخت یک ریزتراشه جهت بلوغ آزمایشگاهی تخمک ارائه شد. شبیه‌سازی و تحلیل

Microchannel Wall,” *Biophysical Journal*, vol. 75, pp. 721–733, 1998.

[۱۵] سیاوش زرگری، طراحی و امکان‌سنجی ساخت یک *Lab on Module* برای استفاده در روش‌های کمک‌باروری (*ART*)، پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشگاه تبریز، تبریز، ۱۰۲، ۱۳۹۳.

زیرنویس‌ها

¹ Assisted Reproductive Technology

² In Vitro Fertilization

³ In Vitro Maturation

⁴ Microfluidic Technology

⁵ Navier–Stokes equations

⁶ Viscous compressible fluid

⁷ Kinematic viscosity

⁸ Viscosity

⁹ No-slip

¹⁰ Human Tubal Fluid

¹¹ Granulosa Cells

¹² Microchamber

¹³ Shear Stress

¹⁴ Soft Lithography

¹⁵ Polydimethylsiloxane

¹⁶ Clean Room

¹⁷ Pre-Polymer

¹⁸ Curing Agent

¹⁹ Curing

²⁰ Bovine Serum Albumins